

## Machine translation JP2004113186

(19) **Publication country** Japan Patent Office (JP)  
(12) **Kind of official gazette** Open patent official report (A)  
(11) **Publication No.** JP,2004-113186,A (P2004-113186A)  
(43) **Date of Publication** April 15, Heisei 16 (2004. 4.15)  
(54) **Title of the Invention** The protein interaction detection approach and the proteinic screening approach

(51) **The 7th edition of International Patent Classification**

C12N 15/09  
C07K 14/47  
C12P 21/02  
C12Q 1/25  
G01N 33/53  
G01N 33/566

**FI**

C12N 15/00        ZNA A  
C07K 14/47  
C12P 21/02        C  
C12Q 1/25  
G01N 33/53        D  
G01N 33/566

**Request for Examination** Un-asking.

**The number of claims** 13

**Mode of Application** OL

**Number of Pages** 16

(21) **Application number** Application for patent 2002-283739 (P2002-283739)

(22) **Filing date** September 27, Heisei 14 (2002. 9.27)

(71) **Applicant**

**Identification Number** 000003160

**Name** Toyobo Co., Ltd.

**Address** 2-2-8, Dojimahama, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka

(72) **Inventor(s)**

**Name** Kawai \*\*

**Address** 10-24, Toyo-cho, Tsuruga-shi, Fukui-ken Inside of Toyobo Co., Ltd.

(72) **Inventor(s)**

**Name** Blackboard Toshihiro

**Address** 10-24, Toyo-cho, Tsuruga-shi, Fukui-ken Inside of Toyobo Co., Ltd.

(72) **Inventor(s)**

**Name** Upper part of a river Fumikiyo

**Address** 10-24, Toyo-cho, Tsuruga-shi, Fukui-ken Inside of Toyobo Co., Ltd.

(72) **Inventor(s)**

**Name** Kawamura Yoshihisa

**Address** 10-24, Toyo-cho, Tsuruga-shi, Fukui-ken Inside of Toyobo Co., Ltd.

**Theme code (reference)**

4B024  
4B063  
4B064  
4H045

**F term (reference)**

4B024 AA11 BA10 BA11 BA63 CA12  
4B063 QA05 QA18 QQ27 QQ33 QQ79 QR07 QR13 QR41 QR48 QS02  
4B064 AG01 CA50 CC24 DA13

BEST AVAILABLE COPY

**(57) Abstract**

**Technical problem** A simple protein interaction analysis method with sufficient repeatability and a screening procedure are offered.

**Means for Solution** How to screen the matter which interacts with this reporter protein by compounding this reporter protein by acellular protein synthesis in the detection approach of the protein interaction characterized by detecting an interaction with other matter using the reporter protein more than a kind under existence of the candidate matter more than a kind this reporter protein and an interaction are expected to be.

---

**Claim(s)**

**Claim 1**

How to screen the matter which interacts with this reporter protein by compounding this reporter protein by acellular protein synthesis in the detection approach of the protein interaction characterized by detecting an interaction with other matter using the reporter protein more than a kind under existence of the candidate matter more than a kind this reporter protein and an interaction are expected to be.

**Claim 2**

The approach according to claim 1 characterized by the candidate matter more than a kind an interaction is expected to be being protein (candidate protein).

**Claim 3**

The approach according to claim 2 characterized by candidate protein being protein obtained by acellular protein composition

**Claim 4**

The approach according to claim 1 to 3 characterized by reporter protein being an enzyme or a receptor.

**Claim 5**

The approach according to claim 1 to 4 characterized by reporter protein being protein which participates in signal transfer.

**Claim 6**

The approach according to claim 1 to 5 that acellular protein synthesis is characterized by using at least one of a wheat germ extract, an Escherichia coli extract, and the reticulocyte lysates.

**Claim 7**

How to acquire this protein inactivated or activated by compounding protein by the acellular protein synthesis approach under existence of the matter which interacts with this protein.

**Claim 8**

How to acquire the protein according to claim 7 characterized by the matter which interacts with protein being protein.

**Claim 9**

The approach according to claim 8 characterized by protein and the protein which interacts being protein activated by variation installation.

**Claim 10**

It is protein of the active type characterized by being protein of an active type or an inactive mold, and compounding the protein of this active type or an inactive mold by the acellular protein synthesis approach under existence of the matter which interacts with this protein, or an inactive mold.

**Claim 11**

Protein of the active type according to claim 10 characterized by the matter which interacts with this protein being protein, or an inactive mold.

**Claim 12**

Protein according to claim 11 characterized by the protein of an active type or an inactive mold and the protein compounded under existence of this protein being signal transfer system protein.

**Claim 13**

Protein according to claim 12 with which signal transfer system protein is characterized by being protein kinase, protein phosphatase, a receptor, and a transcription factor.

---

**Detailed Description of the Invention****0001****Field of the Invention**

This invention relates to the interaction analysis between the protein using the protein by which acellular protein composition was carried out at the detail, and its application more about the approach of detecting the interaction between protein and the matter using the protein by which acellular protein synthesis was carried out.

**0002****Description of the Prior Art**

A cell shows the response of growth, differentiation, gestalt change, cell death, etc. to the stimulus from the external world. Although stressful stimuli, a cell growth factor, a cell differentiation factor, etc. mainly have the stimulus from the external world, it is the intracellular signaling device which these stimuli are transmitted as information and tied up to a cell response. When a signal transfer device functions normally, growth and differentiation of a cell are put on the bottom of very strict control, but once this device is destroyed, a cell will carry out growth fission, without being controlled. Such a cell continues growth to infinity and sometimes comes to form a neoplasm. Since it is such, research of a signal transfer device has been done indispensable to solve the mechanism of tumorigenesis.

**0003**

As a means to transmit these signals by intracellular, the device by proteinic phosphorylation/dephosphorization is raised as especially main systems also acetylation of protein, the device by second messengers, such as cyclic AMP, and in it. A cell activates many transfer devices to one certain stimulus. The signal transfer path sometimes branches or joins, and occasionally, a certain specific factor is presenting the very complicated modality as it is as being concerned with the signal transduction of two or more paths in which relation is not found apparently \*\*\*\*. Therefore, in spite of making research for many years and acquiring very many knowledge, as for this field, many still unknown points are left behind.

**0004**

Information is transmitted by interacting with two or more specific factors with the respectively independent or protein which participates in signal transfer. If an example is given, the MAP kinase which is a kind of protein kinase will receive the phosphorylation by another protein kinase MAP kinase kinase. In response to the phosphorylation by the MAP kinase kinase, it is activated for the first time, you phosphoryze MAPKAPK (MAP kinase activated protein kinase) which is target protein of a MAP kinase, and it is made to be activated, or you phosphoryze a transcription factor, and make it activated, and the MAP kinase is performing gene expression control with which the transcription factor is concerned. a MAP kinase receives

control the singularity of the responsibility protein which phosphorylates a MAP kinase, or the target protein which a MAP kinase phosphorylates is strict, and according to the protein kinase of other type -- there is nothing -- moreover -- or the MAP kinase itself phosphorylates except specific target protein, and it does not control activity

#### **0005**

If the path which activates a MAP kinase is followed for the upstream, the MAP kinase kinase kinase which phosphorylates a MAP kinase kinase further and controls activity exists. Although it is said that the protein with which a MAP kinase kinase kinase is also the existence which has received control by the upstream factor, and is called a MAP kinase kinase kinase kinase to the activation, and the protein called low-molecular-weight G-protein are involving, the device is not yet solved completely.

#### **0006**

As a kind of the protein concerned with activation of a MAP kinase kinase kinase, although protein kinase C is mentioned, this protein kinase C is protein to which that existence became clear by another research from the first, and the relation with a MAP kinase kinase kinase becomes clear by next research. Although a MAP kinase and protein kinase C were known for the field of signal transfer comparatively for many years, about each molecule participating in each other in what kind of path, there are many points \*\*\*\* / un- in this way.

#### **0007**

Even if it limits the protein in connection with signal transfer to that it is supposed that the function has become clear to some extent by current, the number is reaching it at the huge thing. Many researches which search for the relevance in the signal transfer path of each protein have so far been done. However, current is identified still one after another, and the new factor by which it is presupposed that a transfer path \*\*\*\* / un- is participated in about **many** and a signal transfer system clarifies the whole aspect of those relevance, and is conjectured that are not easy and a great effort continued to be needed.

#### **0008**

The method of introducing a gene into other hosts, such as extract purification or Escherichia coli, and an animal cell, from the body tissue which the protein has discovered, carrying out extensive composition of the protein, carrying out extract purification of it, and examining the property within a test tube has been used for research of the protein of a signal transfer system. However, time amount and an effort will be seriously spent on a proteinic extract and purification, and the number of the protein which can be examined though natural will also be limited to them.

#### **0009**

Moreover, the protein which is easy to condense at the time of protein composition formed and insolubilized the inclusions body as a general description of the protein synthesis method using Escherichia coli, and losing the activity as protein and protein as toxicity shown to a host cell had faults, such as having been difficult to compound.

#### **0010**

Furthermore, it faces compounding the protein of a signal transfer system. **the same as that of the living thing kind with which the protein which it is going to discover especially originates, or when using the cell of a close relationship** The effect of phosphorylation, fatty-acid addition, etc. by other signal transfer system protein discovered to the host cell at the proper which is not desirable, for example, effect, was unescapable, and in order to have collected the compounded protein in the so-called intact condition, it was in the situation which must be referred to as unreliable. Moreover, this can say the same thing, also when carrying out isolation purification of the purpose protein from a body tissue.

#### **0011**

Moreover, the superfluous manifestation of the target gene is carried out in the originating cell, and, generally the method of analyzing the function of the purpose gene is used by observing the phenotype. However, by this approach, it can be told to the purpose for which the effectiveness of an intervention of that protein analyzes how it interacts with the protein of others **protein / that / itself** directly since effect appears in the end of a signal transfer path in many cases that it is unsuitable. Moreover, by carrying out a superfluous manifestation, the effect which originally cannot take place sometimes appears plentifully, and it may cause trouble to analyzing an original function in the living body.

#### **0012**

On the contrary, although the approach of there being also an approach called the gene knocking-out method to which deletion of the purpose gene is carried out, growing not cell level but the individual which actually has the genotype, and observing a phenotype was taken, there was the same trouble as the superfluous discovered method.

#### **0013**

Furthermore, it is the analysis approach of an interaction that a Two-hybrid system is also used briskly in recent years. However, this approach also had various limits and there were many troubles -- it is easy to produce the case where an interaction cannot be measured, and false positivity.

#### **0014**

As an approach of conquering the fault of the synthesis method of the protein using the system of the above cells, the protein synthesis method by the acellular protein synthesis system has come to capture the spotlight in recent years. As for current and an acellular protein synthesis system, what used the extract from a living body cell is in use, and what originates in Escherichia coli, a wheat germ, and rabbit reticulocyte also in it is used especially widely. Since supply of a raw material is comparatively easy, more generally the system originating in especially Escherichia coli is used, even if it compares with other two systems. However, Escherichia coli is a prokaryotic cell, and when it is going to compound the protein of the eukaryotic cell origin, especially the protein of the Homo sapiens origin, many examples which fail in composition, without a synthetic system suiting well are seen. Especially composition of the protein which participates in signal transfer has been made difficult **composition** by the cell free system of the Escherichia coli origin in rule of thumb.

#### **0015**

On the other hand, since wheat is eukaryote as compared with the acellular protein synthesis system of the Escherichia coli origin, it is supposed that it is suitable of the protein synthesis system of the wheat origin with human protein synthesis. Moreover, since the ingredient was far supplied easily even if compared with rabbit reticulocyte, it was promising also especially in the acellular protein composition system. However, the combined efficiency was poor by mixing of the protein synthesis inhibitor of internality until now. It became clear that the RNA glycosidase called "Tori Ching" has checked proteinic composition recently, and it turned out that this "Tori Ching" is doing localization to the albumen component of a wheat seed in large quantities. Then, it is reported by by removing an albumen component from a germ nearly completely by washing as a means to raise the effectiveness in the acellular protein synthesis system using a wheat germ extract that protein synthesis effectiveness can be raised now by leaps and bounds (for example, nonpatent literature 1 reference).

#### **0016**

##### **Nonpatent literature 1**

Madin and others (2000) Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 97, 559-564

**0017**

**Problem(s) to be Solved by the Invention**

Since it seemed that it stated above, the approach of screening a simple interaction partner with sufficient repeatability centering on the protein concerning signal transfer was searched for. That is, the purpose of this invention is offering the simple interaction analysis method of protein and the matter with sufficient repeatability, and a screening procedure. Moreover, there are few impurities and it is offering the protein for interaction detection of the protein and the matter which can perform easily and correctly structural change accompanying change of a condition, especially change of activity, and measurement of chemical modification.

**0018**

**Means for Solving the Problem**

In order to attain the aforementioned purpose, under the conditions which added the candidate matter more than a kind with which this invention persons repeat research wholeheartedly and an interaction is expected to be By compounding signal transfer system protein by the acellular protein synthesis system, and making it react mutually This signal transfer system protein is made to activate or inactivate by the interaction of this candidate matter and this signal transfer system protein compounded by the acellular protein synthesis system. By measuring the activity of this signal transfer system protein activated or inactivated, it came to complete a header and this invention for the approach of judging the existence of the interaction between each matter.

**0019**

That is, this invention consists of the following items.

(1) How to screen the matter which interacts with this reporter protein by compounding this reporter protein by acellular protein synthesis in the detection approach of the protein interaction characterized by detecting an interaction with other matter using the reporter protein more than a kind under existence of the candidate matter more than a kind this reporter protein and an interaction are expected to be.

**0020**

(2) The approach given in (1) characterized by the candidate matter more than a kind an interaction is expected to be being protein (candidate protein).

**0021**

(3) An approach given in (2) characterized by candidate protein being protein obtained by acellular protein composition

**0022**

(4) An approach given in either of (1) - (3) characterized by reporter protein being an enzyme or a receptor.

**0023**

(5) An approach given in either of (1) - (4) characterized by reporter protein being protein which participates in signal transfer.

**0024**

(6) Approach given in either of (1) - (5) to which acellular protein synthesis is characterized by using at least one of a wheat germ extract, an Escherichia coli extract, and the reticulocyte lysates.

**0025**

(7) How to acquire this protein inactivated or activated by compounding protein by the acellular protein synthesis approach under existence of the matter which interacts with this protein.

**0026**

(8) How to acquire the protein of a publication to (7) characterized by the matter which interacts with protein being protein.

**0027**

(9) An approach given in (8) characterized by protein and the protein which interacts being protein activated by variation installation.

**0028**

(10) It is protein of the active type characterized by being protein of an active type or an inactive mold, and compounding the protein of this active type or an inactive mold by the acellular protein synthesis approach under existence of the matter which interacts with this protein, or an inactive mold.

**0029**

(11) Protein of an active type given in (10) characterized by the matter which interacts with this protein being protein, or an inactive mold.

**0030**

(12) Protein of an active type or an inactive mold, and protein given in (11) characterized by the protein compounded under existence of this protein being signal transfer system protein.

**0031**

(13) Protein given in (12) to which signal transfer system protein is characterized by being protein kinase, protein phosphatase, a receptor, and a transcription factor.

**0032**

**Embodiment of the Invention**

This invention is the detection approach of the interaction of the protein characterized by detecting the interaction between protein of this reporter protein, and other matter (candidate matter) and other desirable protein (candidate protein) using the protein more than a kind (reporter protein) first. Here, reporter protein means the protein which receives an interaction with candidate protein, and the candidate matter or candidate protein means the matter or protein which expects to give an interaction to reporter protein.

**0033**

Although not limited especially as reporter protein in this invention, what has a measurable change of a condition is desirable in a certain form.

With change in the condition of saying here, it meets and change of the degree of an interaction with other matter, such as change of chemical change of qualification of physical change of the complex formation by association, change of a proteinic spacial configuration, etc. and a protein molecule, dequalification, etc. and activity, etc. is mentioned.

By measuring change of these conditions, the existence of the interaction of receptor protein and other matter is detected.

**0034**

The interaction as used in the field of this invention means that reporter protein receives change of a condition from other matter in a certain form as mentioned above.

As for detection of an interaction, it is desirable to detect by change of the activity as protein from the field of simple nature.

**0035**

From the above-mentioned thing, as reporter protein, the protein in which activity measurement is possible is desirable, and an enzyme or a receptor is specifically desirable from the simplicity of measurement. Although not limited especially as an enzyme, signal transfer system enzymes, such as protein kinase and protein phosphatase, a protease, etc. can be mentioned. Moreover, as a receptor, what the change in enzyme activity is regarded as is preferably used by the interaction. For example, the receptor which has ATPase activity is desirable.

**0036**

Moreover, any of the acellular imprint translation conjugated system which the acellular protein synthesis system in this invention means the technique which compounds protein and a polypeptide based on the information included in nucleic

acids, without using a cell, and carries out based on the information from the acellular translation system which specifically adds mRNA and compounds protein and a polypeptide chain, or DNA, compounds mRNA, and compounds protein and a polypeptide chain further are sufficient.

**0037**

Furthermore, in the acellular protein synthesis system in this invention, a wheat germ extract, an Escherichia coli cell extract, and a reticulocyte lysate are used suitably.

**0038**

Furthermore, a wheat germ extract is used preferably. It is reported that protein synthesis effectiveness can be raised now by leaps and bounds by removing protein synthesis inhibitor recently (Madin K et al. (2000) Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 97, 559-564), and since the product using the principle is sold, it can be said that it is desirable to use (PROTEIOS cell-free protein synthesis kit:Toyobo make) and it.

**0039**

An approach well-known as an approach of compounding protein using the acellular protein synthesis approach can be used as it is, and when using a commercial kit, it can compound according to the description.

**0040**

If the candidate matter used for this invention is conjectured to have a certain effect on activation of reporter protein etc., it is not limited **metal ions / the organic compound of low-molecular and a macromolecule, a saccharide, protein, inorganic ion, and / especially**, but it is desirable that it is protein (candidate protein) as candidate matter in order to analyze the complicated interaction of the protein of an ecosystem.

**0041**

the candidate protein which has in this invention and is -- the extract from a natural product, and a compost -- any are sufficient. In the case of a compost, you may compound using what kind of approach, but the acellular protein synthesis approach is used preferably. Moreover, since there are few impurities, the protein obtained by acellular protein synthesis can measure change of the condition of reporter protein, especially change of activity easily and correctly.

**0042**

Moreover, as for the protein for the interaction detection between protein used for this invention, it is desirable that it is signal transfer system protein. Signal transfer system protein here points out the generic name of a series of protein which participates in an intracellular signaling path, or its part. As protein kinase, as protein phosphatase, KARUSHI new phosphorus, MAP kinase phosphatase, etc. can use an EGF receptor, a PDGF receptor, etc. as a receptor, and, specifically, a MAP kinase, a MAP kinase kinase, proteinkinase C, non-acceptor mold tyrosine kinase, etc. can desirable still more specifically **protein kinase, protein phosphatase a receptor, a transcription factor, etc.** use c-Fos, c-Jun, etc. as a transcription factor.

**0043**

Moreover, in this invention, candidate protein can be easily screened by measuring activity change of these receptor protein.

**0044**

On the other hand, especially as candidate protein as used in the field of this invention, it is not limited but the protein at large considered to interact in reporter protein is included. It is like **the case / in the case of screening, it may be independent in candidate protein, and** the mixture which coexpressed various protein from the library where two or more candidate protein may be made to act on coincidence in, and candidate protein is probably contained further.

**0045**



moreover, as an approach of screening concretely Divide a library into some groups and the protein of the group of each **an acellular protein synthesis system** is made to discover. Acellular composition of the reporter protein is carried out under the conditions which added the pool of the protein made to discover for every group, respectively. The activity of reporter protein is measured, it presumes in which group target candidate protein is contained first, and the approach of dividing a group further, analyzing and going is mentioned.

#### **0046**

Although carried out by using a MAP kinase as reporter protein in the example mentioned later, using the configuration-active type variant (Brunet A et al.(1994) Oncogene 9, 3379-3387) of a MAP kinase kinase as candidate protein That the configuration-active type variant of a MAP kinase kinase exists about 1-/100 among the groups of candidate protein Since it was possible to have measured activation of reporter protein (MAP kinase), it was shown that this invention is very effective in screening.

#### **0047**

Moreover, this invention offers the approach of acquiring the protein inactivated or activated by compounding protein using the acellular protein synthesis approach under existence of the quality of the candidate matter this protein and an interaction are expected to be, and making it react mutually.

#### **0048**

It is the matter which will activate the candidate matter said here if the protein of an active type or an inactive mold and the protein which interacts interact with an active type or the protein of inactivation, it will be made to inactivate if it is protein of an active state, and it is protein of an inactive condition.

#### **0049**

As the protein of an active type or an inactive mold, and protein which interacts, although wild type protein may be used, activation may be required, and if needed, the protein itself can introduce variation, it can be activated and can be used. Point mutation, deletion, etc. can be mentioned as a variation. The configuration-active type variant which does not receive the control from other protein for MEK1 was created in the example which actually shows the significance of this invention, and by introducing two amino acid substitution and one deletion into MEK1 which is a kind of protein kinase showed activation of ERK2 which is a kind of protein kinase to it using this. ERK2 was activated by MEK1 of a variant and the significance of this invention was shown.

#### **0050**

Moreover, this invention is protein activated or inactivated according to the above-mentioned approach. As protein, signal transfer system protein is desirable.

By using this approach, the very complicated activation or adjustment of inactivation protein can be made to finish with a conventional method for a short time very much, and there are few impurities and the protein suitable for using for analysis can be obtained easily.

Therefore, it also becomes easy by using this protein to analyze proteinic activity, structural change in the inactive condition, qualification change, etc.

#### **0051**

Hereafter, the screening procedure of the protein interaction in this invention is explained to a detail.

The thing of what kind of usual presentation may be used for the cell-free extract used for this invention. However, when protein combined efficiency and the simplicity of handling are taken into consideration, it is desirable to use a wheat germ origin extract. When using for acellular protein synthesis reaction mixture DNA which carries out the code of the protein of the purpose besides a cell-free extract, or RNA and DNA, it is optimum dose \*\*\*\*\* about ATP regenerating

systems, such as energy sources, such as RNA polymerase, amino acid, the buffer solution, and ATP or GTP, creatine phosphate, and creatine kinase, a stabilizing agent, a RNase inhibitor, etc. As for reaction temperature, 23 to 26 degree C is suitable.

#### **0052**

mRNA used as the mold of protein synthesis is offered by the imprint reaction by RNA polymerase from DNA. The object of what kind of usual structure may be used for the RNA polymerase used for this invention. However, when mRNA imprint effectiveness and the simplicity of handling are taken into consideration, T7 of marketing and the RNA polymerase of the virus origin of SP6 grade are desirable.

#### **0053**

The template DNA used for this invention has the promoter array which RNA polymerase combines, and the structure where the open reading frame of the purpose gene is arranged on the lower stream of a river. Desirably, that in which a translation enhancement array is included between a promoter and an open reading frame is good. Moreover, it is desirable that it is the gestalt of the plasmid DNA arranged on a suitable vector. Where all DNA that carries out the code of the protein to compound is mixed, the 1 system of reaction may perform the imprint of DNA in this invention, and, of course, it may compound RNA separately from the gene which carries out the code of each protein, and may mix each RNA at a rate of arbitration after composition.

#### **0054**

The gene of the candidate protein used for this invention may choose as arbitration the gene of the known protein with which possibility of interacting to reporter protein is suggested, or the gene of protein strange on a functional target with high possibility of doing an operation structurally, and may include all genes at random or comprehensively.

#### **0055**

##### **Example**

An example explains the detail of the invention in this application. The invention in this application is not limited at all by these examples.

#### **0056**

##### **Example 1**

Cloning of Homo sapiens origin ERK2 (MAPK1) gene

Isolation purification of the mRNA of the HeLa-cell origin was carried out, and cDNA was compounded by the reverse transcription reaction by making this into mold. ReverTra Ace (R) and the (Toyobo make) were used for the reverse transcription reaction. The PCR reaction was performed by using compound cDNA as mold using sense primer MAPK1-F (array number 1) and antisense primer MAPK1-R (array number 2). an PCR reaction -- KOD-Plus-DNA polymerase (Toyobo make) -- using it -- each primer 50pmol, magnesium sulfate 1mM, dATP, dTTP, dCTP, and dGTP -- 0.2 mM(s) each and KOD-Plus- an exclusive buffer -- 1x concentration and KOD-Plus- the system of reaction of DNA polymerase 1 unit and the 50micro of the last volume l -- 94-degree-C 2 minutes, and **94-degree-C 15 seconds and 60-degree-C 20 seconds, and 68-degree-C 1 minute** -- x -- it reacted at the temperature of 25 cycle. The PCR product was refined, subcloning was performed to the EcoRV site of exclusive vector pEU3-NII of acellular protein synthesis kit "PROTEIOS (TM)" attachment, and plasmid pEU-MAPK1 was built.

#### **0057**

##### **Example 2**

Cloning of the configuration-active type variant of Homo sapiens origin MEK1 gene  
Magnification of MEK1 gene and installation of configuration-active type variation were performed to coincidence by performing nested-PCR of five steps by using as mold cDNA which carried out reverse transcription from mRNA of the HeLa-cell

origin.

Isolation purification of the mRNA of the HeLa-cell origin was carried out, and, specifically, cDNA was compounded by the reverse transcription reaction by making this into mold. ReverTra Ace (R) and the (Toyobo make) were used for the reverse transcription reaction. The PCR reaction was performed by using compound cDNA as mold using sense primer MEK1-F (array number 3) and antisense primer MEK1-R (array number 4) (first step). an PCR reaction -- KOD-Plus- DNA polymerase (Toyobo make) -- using it -- each primer 50pmol, magnesium sulfate 1mM, dATP, dTTP, dCTP, and dGTP -- 0.2 mM(s) each and KOD-Plus- an exclusive buffer -- 1x concentration and KOD-Plus- the system of reaction of DNA polymerase 1 unit and the 50micro of the last volume | -- 94-degree-C 2 minutes, and **94-degree-C 15 seconds and 60-degree-C 20 seconds, and 68-degree-C 1 minute** -- x -- it reacted at the temperature of 20 cycle. The PCR reaction was performed by the same reaction condition as the above by using the amplified PCR product as mold using the primer of two sorts of combination of sense primer MEK1-F, antisense primer MEK1-CAR (array number 5), and sense primer MEK1-CAF (array number 6) and antisense primer MEK1-R (the second step). The base sequence which introduces amino acid substitution (Ser218Glu, Ser222Glu) is included in MEK1-CAF and MEK1-CAR. The PCR reaction was performed by the same reaction condition as the above by using two sorts of PCR products as mold using sense primer MEK1-F and antisense primer MEK1-R (the third step). The PCR reaction was performed by the same reaction condition as the above by using the amplified PCR product as mold using the primer of two sorts of combination of sense primer MEK1-F, antisense primer MEK1-AaR (array number 7), and sense primer MEK1-AaF (array number 8) and antisense primer MEK1-R (the fourth step). The base sequence which introduces the silence variation which destroys at least the Aat I cutting section of the 525th place is included in MEK1-AaF and MEK1-AaR. The PCR reaction was performed by the same reaction condition as the above by using two sorts of PCR products as mold using sense primer MEK1-F and antisense primer MEK1-R (the fifth step). Subcloning of the amplified PCR product was carried out to the EcoRV site of the above-mentioned pEU3-NII vector, and intermediate-field plasmid pEU-MEK1-XE was built. By cutting this plasmid to two Aat I sites, and connecting again at a Ligation reaction, deletion of the DNA fragment in the meantime was carried out, and pEU-MEK1-CA was built.

**0058**

### Example 3

Composition by the acellular protein synthesis system of a MEK1 configuration-active type variant

It is Thermo T7, using the above-mentioned plasmid pEU-MEK1-CA as mold. mRNA was compounded by RNA polymerase (Toyobo make), respectively. The buffer permutation of the compound mRNA was carried out at the buffer mix solution of purification and "PROTEIOS (TM)" attachment using the G-25micro spin column (product made from Amersham), and acellular protein synthesis by the superposition method was performed.

A superposition method reaction is set on 96 hole plate. Sterilized water 1.8microl, buffer #2 2.0microl of "PROTEIOS (TM)" attachment, Creatine kinase (10mg/(ml)) 1.7microl of "PROTEIOS (TM)" attachment, RNase inhibitor (40U/mul, Toyobo make) 1.0microl, wheat germ extract 10.0microl of "PROTEIOS (TM)" attachment, It carried out by carrying out multistory **of the reaction mix solution which consists of purification mRNA liquid (0.3-0.4microg/mul) 33.5microl of the pEU-MAPK1 origin which carried out the buffer permutation** to the bottom of 250micro of buffer mix solutions | beforehand poured distributively on 96 hole plate. The reaction was performed at 26 degrees C for 16 hours. The buffer permutation of the compound ERK2 protein was carried out at the buffer mix solution of

purification and "PROTEIOS (TM)" attachment using the G-25micro spin column.

#### 0059

##### Example 4

Composition by the acellular protein synthesis system of ERK2 under MEK1 configuration-active type variant existence

It is Thermo T7, using above-mentioned plasmid pEU-MAPK1 as mold. mRNA was compounded by RNA polymerase (Toyobo make), respectively. The buffer permutation of the compound mRNA was carried out at the buffer mix solution of purification and "PROTEIOS (TM)" attachment using the G-25micro spin column (product made from Amersham), and acellular protein synthesis by the superposition method was performed.

A superposition method reaction is set on 96 hole plate. Sterilized water 1.8microl, buffer #2 2.0microl of "PROTEIOS (TM)" attachment, Creatine kinase (10mg/(ml)) 1.7microl of "PROTEIOS (TM)" attachment, RNase inhibitor (40U/mul, Toyobo make) 1.0microl, wheat germ extract 10.0microl of "PROTEIOS (TM)" attachment, Purification mRNA solution (0.3-0.4microg/mul) 13.4microl of the pEU-ERK2 origin which carried out the buffer permutation, It carried out by carrying out multistory **of the reaction mix solution which consists of purification protein solution 20.1microl of the MEK1 configuration-active type variant which carried out the buffer permutation** to the bottom of 250micro of buffer mix solutions I beforehand poured distributively on 96 hole plate. The reaction was performed at 26 degrees C for 16 hours.

#### 0060

##### Example 5

Enzyme activity measurement of ERK2

Activity measurement of ERK2 compounded by acellular protein synthesis was performed.

Specifically, the buffer permutation was performed for acellular protein synthesis reaction termination liquid to the MAP kinase buffer (25 mM Tris-HCl, pH7.5, 0.5mM EDTA, 0.5mM EGTA, 0.05% Triton X-100) using the G-25micro spin column (product made from Amersham). Activity measurement was performed by using the protein solution after this buffer permutation as sample liquid. p42 / p44 MAP Kinase Enzyme Assay System (product made from Amersham) was used for activity measurement.

The result is shown in drawing 1 . The enhancement of activity whose ERK2 at the time of adding a MEK1 configuration-active type variant and performing an acellular protein composition reaction compared with ERK2 at the time of performing a synthetic reaction, without adding a MEK1 configuration-active type variant exceeds 1000 times was checked. It came to be proved anew that this result has the relation with which it has suggested strongly that ERK2 was activated by MEK1, saying, and two kinds of this protein interacts. It is thought that this result is a good example which shows that it is a means effective in proving the existence of the interaction of the protein whose this invention is two kinds with mutual indefinite relation, and it is expected that the application to the signal transfer system protein of other classes is attained.

#### 0061

##### Example 6

Coincidence composition by the acellular protein synthesis system of a MEK1 configuration-active type variant and other protein

It is Thermo T7, using as mold what mixed the plasmid mixed liquor (the following, library) which carried out equivalent mixing of 99 kinds of unrelated genes which carried out cloning to the pEU3-NII vector as well as above-mentioned plasmid pEU-MAPK1, and the above-mentioned pEU-MEK1-CA, respectively at a rate of 1:1. mRNA was compounded by RNA polymerase (Toyobo make). The buffer

permutation of the compound mRNA was carried out at the buffer mix solution of purification and "PROTEIOS (TM)" attachment using the G-25micro spin column (product made from Amersham), and acellular protein synthesis by the superposition method was performed.

A superposition method reaction is set on 96 hole plate. Sterilized water 1.8microl, buffer #2 2.0microl of "PROTEIOS (TM)" attachment, Creatine kinase (10mg/(ml)) 1.7microl of "PROTEIOS (TM)" attachment, RNase inhibitor (40U/mul, Toyobo make) 1.0microl, wheat germ extract 10.0microl of "PROTEIOS (TM)" attachment, It carried out by carrying out multistory **of the reaction mix solution which consists of purification mRNA equivalent mixed liquor (0.3-0.4microg/mul) 33.5microl of the library origin which carried out the buffer permutation** to the bottom of 250micro of buffer mix solutions I beforehand poured distributively on 96 hole plate. The reaction was performed at 26 degrees C for 16 hours.

#### 0062

##### Example 7

Composition by the MEK1 configuration-active type variant and the acellular protein synthesis system of ERK2 under other protein existence

It is Thermo T7, using above-mentioned plasmid pEU-MAPK1 as mold. mRNA was compounded by RNA polymerase (Toyobo make), respectively. The buffer permutation of the compound mRNA was carried out at the buffer mix solution of purification and "PROTEIOS (TM)" attachment using the G-25micro spin column (product made from Amersham), and acellular protein synthesis by the superposition method was performed.

A superposition method reaction is set on 96 hole plate. Sterilized water 1.8microl, buffer #2 2.0microl of "PROTEIOS (TM)" attachment, Creatine kinase (10mg/(ml)) 1.7microl of "PROTEIOS (TM)" attachment, RNase inhibitor (40U/mul, Toyobo make) 1.0microl, wheat germ extract 10.0microl of "PROTEIOS (TM)" attachment, Purification mRNA solution (0.3-0.4microg/mul) 13.4microl of the pEU-ERK2 origin which carried out the buffer permutation, It carried out by carrying out multistory **of the reaction mix solution which consists of purification protein solution 20.1microl of the library origin which carried out the buffer permutation** to the bottom of 250micro of buffer mix solutions I beforehand poured distributively on 96 hole plate. The reaction was performed at 26 degrees C for 16 hours.

#### 0063

##### Example 8

Enzyme activity measurement of ERK2

Activity measurement of ERK2 compounded by the acellular protein synthesis system was performed.

Specifically, the buffer permutation was performed for acellular protein synthesis reaction termination liquid to the MAP kinase buffer (25 mM Tris-HCl, pH7.5, 0.5mM EDTA, 0.5mM EGTA, 0.05% Triton X-100) using the G-25micro spin column (product made from Amersham). Activity measurement was performed by using the protein solution after this buffer permutation as sample liquid. p42 / p44 MAP Kinase Enzyme Assay System (product made from Amersham) was used for activity measurement.

The result is shown in drawing 2 . When activity of ERK2 at the time of constituting the protein added beforehand only from a MEK1 configuration-active type variant was set to 100, the activity at the time of adding the protein of the library origin was set to 18. Although the amount of manifestations of MEK1 was imagined to be the 1/100 order of ERK2, and it was less than the case where it is made discovered with equivalence, it was shown that MEK1 is acting on ERK2 clearly. It is guessed easily that the gene of the strangeness which exerts an interaction on ERK2 from this result using the gene expression library which consists of 100 clones around one pool, or known protein can be identified. Moreover, it is guessed easily that this

result can be applied and the gene of the strangeness which affects a certain specific signal transfer system protein, or known protein can be identified.

#### **0064**

##### **Effect of the Invention**

the high of the matter which controls the activity of a certain protein by this invention -- throughput screening was attained. By furthermore using the approach of this invention, the protein activated or inactivated can be adjusted now efficiently and simple. therefore, according to this invention, purpose protein can be activated or inactivated, and the matter **like** can be screened easily, and activation or inactivation \*\*\*\*\* protein can be adjusted simple. Moreover, various matter can investigate the effect which it has on protein, and can contribute to the elucidation of the effect which it has on the toxicity of the matter, or a living body, the elucidation of a disease, development of drugs, etc.

#### **0065**

##### **Layout Table**

Array number 1

The die length of an array: 21

The mold of an array: Nucleic acid (DNA)

The number of chains: Single strand

Topology: The shape of a straight chain

The class of array: Synthetic DNA

Array

CTTCCTTCCT CTCCCGGTCA G

#### **0066**

Array number 2

The die length of an array: 21

The mold of an array: Nucleic acid (DNA)

The number of chains: Single strand

Topology: The shape of a straight chain

The class of array: Synthetic DNA

Array

CCTCTGAGCC CTTGTCCTGA C

#### **0067**

Array number 3

The die length of an array: 20

The mold of an array: Nucleic acid (DNA)

The number of chains: Single strand

Topology: The shape of a straight chain

The class of array: Synthetic DNA

Array

ATGCCCAAGA AGAAGCCGAC

#### **0068**

Array number 4

The die length of an array: 20

The mold of an array: Nucleic acid (DNA)

The number of chains: Single strand

Topology: The shape of a straight chain

The class of array: Synthetic DNA

Array

TTAGACGCCA GCAGCATGGG

#### **0069**

Array number 5

The die length of an array: 30

The mold of an array: Nucleic acid (DNA)

The number of chains: Single strand  
Topology: The shape of a straight chain  
The class of array: Synthetic DNA  
Array  
GAACTCGTTG GCCATCTCGT CGATGAGCTG  
**0070**

Array number 6  
The die length of an array: 29  
The mold of an array: Nucleic acid (DNA)  
The number of chains: Single strand  
Topology: The shape of a straight chain  
The class of array: Synthetic DNA  
Array  
GACGAGATGG CCAACGAGTT CGTGGGCAC  
**0071**

Array number 7  
The die length of an array: 22  
The mold of an array: Nucleic acid (DNA)  
The number of chains: Single strand  
Topology: The shape of a straight chain  
The class of array: Synthetic DNA  
Array  
ACATATGTCA GTCCTTTTAT TA  
**0072**

Array number 8  
The die length of an array: 22  
The mold of an array: Nucleic acid (DNA)  
The number of chains: Single strand  
Topology: The shape of a straight chain  
The class of array: Synthetic DNA  
Array  
TAATAAAAGG ACTGACATAT CT

#### **Brief Description of the Drawings**

**Drawing 1** Drawing showing the enzyme activity of the ERK2 protein at the time of not making it discovered with the case where a MEK1 configuration-active type variant is made to discover under existence of ERK2.

The activity (addition activity of  $^{32}\text{P}$  to a substrate peptide) of ERK2 is shown on an axis of ordinate, and the dilution ratio of a sample is shown on an axis of abscissa.

(independent) : When it reacts without adding mRNA, and mRNA of the :(manifestation) pEU-MEK1-CA origin was added and MEK1-CA is made to discover, : (control) When ERK2 is not added to the system of reaction.

**Drawing 2** Drawing showing the enzyme activity of the ERK2 protein at the time of making the library containing a MEK1 configuration-active type variant gene discover under ERK2 protein existence.

The relative activity of ERK2 is shown on an axis of abscissa. When the activity value of ERK2 at the time of adding mRNA which consists of only things of the pEU-MEK1-CA origin was set to 100 and mRNA of the library origin is added (library)

The relative value at the time of making it discovered by ERK2 independent one (control) is shown.

---

#### **Brief Description of the Drawings**

**Drawing 1** Drawing showing the enzyme activity of the ERK2 protein at the time of

not making it discovered with the case where a MEK1 configuration-active type variant is made to discover under existence of ERK2.

The activity (addition activity of 32P to a substrate peptide) of ERK2 is shown on an axis of ordinate, and the dilution ratio of a sample is shown on an axis of abscissa.

(independent) : When it reacts without adding mRNA, and mRNA of

the : (manifestation) pEU-MEK1-CA origin was added and MEK1-CA is made to

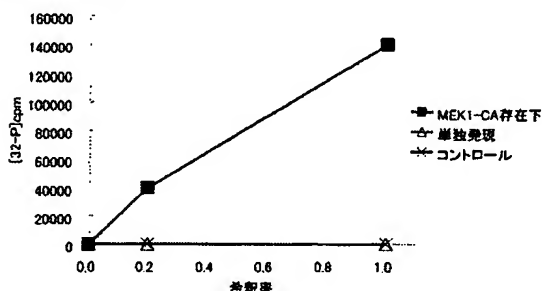
discover, : (control) When ERK2 is not added to the system of reaction.

**Drawing 2** Drawing showing the enzyme activity of the ERK2 protein at the time of making the library containing a MEK1 configuration-active type variant gene discover under ERK2 protein existence.

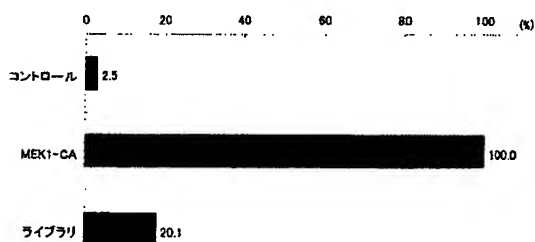
The relative activity of ERK2 is shown on an axis of abscissa. When the activity value of ERK2 at the time of adding mRNA which consists of only things of the pEU-MEK1-CA origin was set to 100 and mRNA of the library origin is added (library)

The relative value at the time of making it discovered by ERK2 independent one (control) is shown.

**Drawing 1**



**Drawing 2**





(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-113186

(P2004-113186A)

(43) 公開日 平成16年4月15日(2004.4.15)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 14/47	4 B 0 6 3
C 1 2 P 21/02	C 1 2 P 21/02 C	4 B 0 6 4
C 1 2 Q 1/25	C 1 2 Q 1/25	4 H 0 4 5
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53 D	

審査請求 未請求 請求項の数 13 O L (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-283739 (P2002-283739)	(71) 出願人	000003160
(22) 出願日	平成14年9月27日 (2002. 9. 27)		東洋紡績株式会社
			大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号
		(72) 発明者	川井 淳
			福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社内
		(72) 発明者	黒板 敏弘
			福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社内
		(72) 発明者	川上 文清
			福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社内
		(72) 発明者	川村 良久
			福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質相互作用検出方法およびタンパク質のスクリーニング方法

## (57) 【要約】

【課題】 簡便かつ再現性のよいタンパク質相互作用解析法、スクリーニング法を提供する。

【解決手段】 一種以上のレポータータンパク質を用いて他の物質との相互作用を検出することを特徴とするタンパク質相互作用の検出方法において、該レポータータンパク質と相互作用の予想される一種以上の候補物質の存在下で該レポータータンパク質を無細胞タンパク質合成により合成することにより、該レポータータンパク質と相互作用する物質をスクリーニングする方法。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

一種以上のレポータータンパク質を用いて他の物質との相互作用を検出することを特徴とするタンパク質相互作用の検出方法において、該レポータータンパク質と相互作用の予想される一種以上の候補物質の存在下で該レポータータンパク質を無細胞タンパク質合成により合成することにより、該レポータータンパク質と相互作用する物質をスクリーニングする方法。

**【請求項 2】**

相互作用の予想される一種以上の候補物質がタンパク質（候補タンパク質）であることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

10

**【請求項 3】**

候補タンパク質が無細胞タンパク合成により得られたタンパク質であることを特徴とする請求項 2 に記載の方法

**【請求項 4】**

レポータータンパク質が酵素またはレセプターであることを特徴とする請求項 1～3 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 5】**

レポータータンパク質がシグナル伝達に関与するタンパク質であることを特徴とする請求項 1～4 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 6】**

無細胞タンパク質合成が、コムギ胚芽抽出液、大腸菌抽出液および、網状赤血球抽出液の少なくとも 1 つを用いることを特徴とする請求項 1～5 のいずれかに記載の方法。

20

**【請求項 7】**

タンパク質を該タンパク質と相互作用する物質の存在下で無細胞タンパク質合成方法にて合成することにより、不活性化もしくは活性化された該タンパク質を取得する方法。

**【請求項 8】**

タンパク質と相互作用する物質がタンパク質であることを特徴とする請求項 7 に記載のタンパク質を取得する方法。

**【請求項 9】**

タンパク質と相互作用するタンパク質が変異導入により活性化されたタンパク質であることを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

30

**【請求項 10】**

活性型もしくは不活性型のタンパク質であって、該活性型もしくは不活性型のタンパク質は、該タンパク質と相互作用する物質の存在下で無細胞タンパク質合成方法にて合成されたものであることを特徴とする活性型もしくは不活性型のタンパク質。

**【請求項 11】**

該タンパク質と相互作用する物質がタンパク質であることを特徴とする請求項 10 に記載の活性型もしくは不活性型のタンパク質。

**【請求項 12】**

活性型もしくは不活性型のタンパク質および、該タンパク質の存在下で合成されたタンパク質がシグナル伝達系タンパク質であることを特徴とする請求項 11 に記載のタンパク質。

40

**【請求項 13】**

シグナル伝達系タンパク質が、プロテインキナーゼ、プロテインホスファターゼ、レセプターおよび、転写因子であることを特徴とする請求項 12 に記載のタンパク質。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、無細胞タンパク質合成されたタンパク質を用いてタンパク質と物質間の相互作用を検出する方法に関し、より詳細には、無細胞タンパク質合成されたタンパク質を用いる

50

タンパク質間相互作用解析およびその応用に関する。

【0002】

【従来の技術】

細胞は外界からの刺激に対し、増殖、分化、形態変化、細胞死等の応答を示す。外界からの刺激は、主にストレス刺激、細胞増殖因子、細胞分化因子などがあるが、これらの刺激を情報として伝達し、細胞応答へ結びつけるのが、細胞内シグナル伝達機構である。シグナル伝達機構が正常に機能することにより、細胞の増殖や分化は、極めて厳密な制御の下に置かれているが、この機構がひとたび破壊されると、細胞は制御されことなく成長分裂することとなる。そのような細胞は無限に増殖を続け、ときに腫瘍を形成するに至る。このようなことから、シグナル伝達機構の研究は、腫瘍形成のメカニズムを解明するのに必要不可欠であるとされてきた。

【0003】

細胞内でこれらのシグナルを伝達する手段としては、タンパク質のアセチル化や、サイクリックAMP等の二次メッセンジャーによる機構、また、そのなかでも特に主要なシステムとして、タンパク質のリン酸化／脱リン酸化による機構があげられる。細胞は、ある一つの刺激に対して、いくつもの伝達機構を活性化させる。そのシグナル伝達経路は、ときに枝分かれし、あるいは合流し、ときにはある特定の因子が、一見関係のみられない複数の経路の情報伝達に関わっていたりと、極めて複雑な様相を呈している。そのため、この分野は古くから研究がなされ、非常に多くの知見が得られているにもかかわらず、未だ不明な点が数多く残されている。

【0004】

シグナル伝達に関与するタンパク質は、それぞれ単独あるいは複数の特定の因子と相互作用することにより、情報の伝達を行っている。一例を挙げると、タンパク質リン酸化酵素の一種であるMAPキナーゼは、別のタンパク質リン酸化酵素MAPキナーゼキナーゼによるリン酸化を受ける。MAPキナーゼはMAPキナーゼキナーゼによるリン酸化を受けて初めて活性化し、MAPキナーゼの標的タンパク質であるMAPKAPK (MAP kinase activated protein kinase) をリン酸化して活性化させたり、あるいは転写因子をリン酸化して活性化させ、その転写因子に関わる遺伝子の発現制御を行ったりしている。MAPキナーゼをリン酸化する責任タンパク質、あるいはMAPキナーゼがリン酸化する標的タンパク質の特異性は厳密であり、MAPキナーゼは他種のタンパク質リン酸化酵素による制御を受けることはなく、またあるいはMAPキナーゼ自身が特定の標的タンパク質以外をリン酸化して活性を制御することもない。

【0005】

MAPキナーゼを活性化する経路を上流にたどると、さらにMAPキナーゼキナーゼをリン酸化して活性を制御する、MAPキナーゼキナーゼキナーゼが存在している。MAPキナーゼキナーゼキナーゼもまた、上流の因子により制御を受けている存在であり、その活性化にはMAPキナーゼキナーゼキナーゼキナーゼと呼ばれるタンパク質や、低分子量Gタンパク質と呼ばれるタンパク質が関与していると言われているが、その機構は未だ完全には解明されていない。

【0006】

MAPキナーゼキナーゼキナーゼの活性化に関わっているタンパク質の一種として、プロテインキナーゼCが挙げられているが、このプロテインキナーゼCは元々別の研究によりその存在が明らかになったタンパク質であり、MAPキナーゼキナーゼキナーゼとの関連は後の研究により判明したものである。MAPキナーゼも、プロテインキナーゼCも、シグナル伝達の分野では比較的古くから知られていたものではあるが、このように、個々の分子がどのような経路でお互いに関与しているのかについては、未解明な点が多い。

【0007】

シグナル伝達に関わるタンパク質は、現在までにその機能がある程度判明しているとされるものに限定しても、その数は膨大なものにのぼっている。それぞれのタンパク質のシグナル伝達経路における関連性を探索する研究が、これまでも数多く行われてきた。しか

しながら、未解明な伝達経路が多いばかりか、シグナル伝達系に関与するとされる新規な因子が、現在もなお続々と同定されており、それらの関連性の全貌を明らかにする容易ではなく、今後も多大なる労力が必要とされると推測される。

#### 【0008】

シグナル伝達系のタンパク質の研究には、そのタンパク質が発現している生体組織から抽出精製、あるいは大腸菌や動物細胞等の他の宿主に遺伝子を導入してタンパク質を大量合成し、それを抽出精製して試験管内でその特性を検討するといった方法が用いられてきた。しかしながら、タンパク質の抽出、精製には、時間、労力ともに多大に費やされ、当然ながら検討できるタンパク質の数も限定されてしまう。

#### 【0009】

また、大腸菌を用いたタンパク質合成法の一般的な特徴として、タンパク合成時に凝集しやすいタンパク質は、インクルージョンボディを形成して不溶化してしまい、タンパク質としての活性を失ってしまうことや、宿主細胞に対して毒性を示すようなタンパク質は合成が困難であったことなどの欠点があった。

#### 【0010】

さらに、シグナル伝達系のタンパク質を合成するに際しては、特に発現しようとするタンパク質の由来する生物種と同一または近縁の細胞を用いる場合においては、宿主細胞に固有に発現している他のシグナル伝達系タンパク質による望ましくない影響、例えばリン酸化や脂肪酸付加などの影響が不可避であり、合成されたタンパク質を、いわゆるインタクトな状態で回収するには、信頼性が低いと言わざるを得ない状況であった。またこれは、生体組織から目的タンパク質を単離精製する場合にも同じことが言える。

#### 【0011】

また、目的の遺伝子をその由来する細胞において過剰発現させ、その表現型を観察することによって目的遺伝子の機能を解析するといった方法が一般に用いられている。ただ、この方法では、そのタンパク質の関与の効果がシグナル伝達経路の末端に影響が現れることが多いため、そのタンパク質自体が他のタンパク質と直接的にどのように相互作用するかを解析する目的には不向きであるといえる。その上、過剰発現することによって、生体内では本来起こり得ないような影響が現れることも多々あり、本来の機能を解析するのに支障をきたすこともある。

#### 【0012】

逆に、目的遺伝子を欠失させる遺伝子ノックアウト法と呼ばれる方法もあり、細胞レベルではなく、実際にその遺伝子型を持つ個体を生育させて表現形を観察するといった方法をとるが、過剰発現法と同じような問題点があった。

#### 【0013】

更に、Two-hybridシステムも近年盛んに使用される相互作用の解析方法である。ただ、この方法にも様々な制限があり、相互作用が測定できない場合や、偽陽性が生じやすいなどの問題点が多くあった。

#### 【0014】

前述のような細胞の系を用いたタンパク質の合成法の欠点を克服する方法として、近年、無細胞タンパク質合成系によるタンパク質合成法が注目を浴びるようになってきた。現在、無細胞タンパク質合成系は、生体細胞からの抽出液を用いたものが主流であり、その中でも、大腸菌、コムギ胚芽、ウサギ網状赤血球に由来するものが特に広く用いられている。特に大腸菌に由来する系は、原料の供給が比較的容易であることもあり、他の二つの系と比較してもより一般的に用いられている。しかしながら、大腸菌は原核細胞であり、真核細胞由来のタンパク質、特にヒト由来のタンパク質を合成しようとした場合、合成システムがうまく適合せずに合成に失敗する例が数多く見られる。特に、シグナル伝達に関与するタンパク質の合成は、経験則的に大腸菌由来の無細胞系では合成が困難であるとされてきた。

#### 【0015】

一方、大腸菌由来の無細胞タンパク質合成系と比較して、コムギ由来のタンパク質合成系

10

20

30

40

50

は、コムギが真核生物であることから、ヒトのタンパク質合成により適しているとされている。また、ウサギ網状赤血球と比較しても、材料が遥かに容易に供給されることもあり、無細胞タンパク合成系の中でも特に期待が持たれていた。しかしながらこれまで、内在性のタンパク質合成阻害物質の混入により、その合成効率は芳しいものではなかった。最近、“トリチン”と呼ばれるRNAグリコシダーゼがタンパク質の合成を阻害していることが明らかになり、また、この“トリチン”はコムギ種子の胚乳成分に大量に局在していることが分かった。そこで、コムギ胚芽抽出液を用いる無細胞タンパク質合成系における効率を上昇させる手段として、胚芽より胚乳成分を洗浄によってほぼ完全に除去することにより、タンパク質合成効率を飛躍的に向上させることが出来るようになることが報告されている（例えば、非特許文献1参照）。 10

【0016】

【非特許文献1】

Madinら、(2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97, 559-564

【0017】

【発明が解決しようとする課題】

上に述べたような理由から、シグナル伝達に係わるタンパク質を中心として、簡便かつ再現性の良い、相互作用パートナーをスクリーニングする方法が求められていた。すなわち、本発明の目的は簡便かつ再現性のよいタンパク質と物質の相互作用解析法、スクリーニング法を提供することである。また、不純物が少なく、状態の変化、特に活性の変化に伴う構造変化や化学的修飾の測定を容易にかつ正確に行うことができるタンパク質と物質との相互作用検出用タンパク質を提供することである。 20

【0018】

【課題を解決するための手段】

前記の目的を達成するために、本発明者らは鋭意研究を重ね、相互作用の予想される一種以上の候補物質を加えた条件下で、無細胞タンパク質合成系でシグナル伝達系タンパク質を合成して相互に反応させることにより、該候補物質と無細胞タンパク質合成系で合成された該シグナル伝達系タンパク質の相互作用により該シグナル伝達系タンパク質を活性化または不活性化させ、活性化または不活性化された該シグナル伝達系タンパク質の活性を測定することにより、各物質間の相互作用の有無を判定する方法を見出し、本発明を完成 30

【0019】

すなわち本発明は以下の項目よりなる。

(1) 一種以上のレポータータンパク質を用いて他の物質との相互作用を検出することを特徴とするタンパク質相互作用の検出方法において、該レポータータンパク質と相互作用の予想される一種以上の候補物質の存在下で該レポータータンパク質を無細胞タンパク質合成により合成することにより、該レポータータンパク質と相互作用する物質をスクリーニングする方法。

【0020】

(2) 相互作用の予想される一種以上の候補物質がタンパク質（候補タンパク質）であることを特徴とする(1)記載の方法。 40

【0021】

(3) 候補タンパク質が無細胞タンパク合成により得られたタンパク質であることを特徴とする(2)に記載の方法

【0022】

(4) レポータータンパク質が酵素またはレセプターであることを特徴とする(1)～(3)のいずれかに記載の方法。

【0023】

(5) レポータータンパク質がシグナル伝達に関与するタンパク質であることを特徴とする(1)～(4)のいずれかに記載の方法。 50

## 【0024】

(6) 無細胞タンパク質合成が、コムギ胚芽抽出液、大腸菌抽出液および、網状赤血球抽出液の少なくとも1つを用いることを特徴とする(1)～(5)のいずれかに記載の方法。

## 【0025】

(7) タンパク質を該タンパク質と相互作用する物質の存在下で無細胞タンパク質合成方法にて合成することにより、不活性化もしくは活性化された該タンパク質を取得する方法。

## 【0026】

(8) タンパク質と相互作用する物質がタンパク質であることを特徴とする(7)に記載のタンパク質を取得する方法。 10

## 【0027】

(9) タンパク質と相互作用するタンパク質が変異導入により活性化されたタンパク質であることを特徴とする(8)に記載の方法。

## 【0028】

(10) 活性型もしくは不活性型のタンパク質であって、該活性型もしくは不活性型のタンパク質は、該タンパク質と相互作用する物質の存在下で無細胞タンパク質合成方法にて合成されたものであることを特徴とする活性型もしくは不活性型のタンパク質。

## 【0029】

(11) 該タンパク質と相互作用する物質がタンパク質であることを特徴とする(10)に記載の活性型もしくは不活性型のタンパク質。 20

## 【0030】

(12) 活性型もしくは不活性型のタンパク質および、該タンパク質の存在下で合成されたタンパク質がシグナル伝達系タンパク質であることを特徴とする(11)に記載のタンパク質。

## 【0031】

(13) シグナル伝達系タンパク質が、プロテインキナーゼ、プロテインホスファターゼ、レセプターおよび、転写因子であることを特徴とする(12)に記載のタンパク質。

## 【0032】

## 【発明の実施の形態】

30

まず本発明は、一種以上のタンパク質(レポータータンパク質)を用いて、該レポータータンパク質と他の物質(候補物質)、好ましくは他のタンパク質(候補タンパク質)とのタンパク質間相互作用を検出することを特徴とするタンパク質の相互作用の検出方法である。ここで、レポータータンパク質とは候補タンパク質によって相互作用を受けるタンパク質を意味し、また、候補物質もしくは候補タンパク質とはレポータータンパク質に対して相互作用を与えることを期待する物質もしくはタンパク質を意味する。

## 【0033】

本発明におけるレポータータンパク質としては特に限定されないが、何らかの形で状態の変化が測定可能であるものが好ましい。

ここで言う状態の変化とは、会合し、結合による複合体形成、タンパク質の立体構造の変化等の物理学的変化、タンパク質分子の修飾、脱修飾等の化学的変化、活性の変化等の他の物質との相互作用の度合いの変化などが挙げられる。 40

これら状態の変化を測定することにより、レセプタータンパク質と他の物質との相互作用の有無を検出する。

## 【0034】

本発明でいう相互作用とは、上記のようにレポータータンパク質が他の物質から何らかの形で状態の変化を受けることを言う。

相互作用の検出は、簡便性の面からタンパク質としての活性の変化により検出することが好ましい。

## 【0035】

50

上記のことから、レポータータンパク質としては、測定の簡便さから、活性測定可能なタンパク質が好ましく、具体的には酵素もしくはレセプターが好ましい。酵素としては特に限定されないが、プロテインキナーゼやプロテインホスファターゼなどのシグナル伝達系酵素、プロテアーゼなどを挙げることが出来る。また、レセプターとしては、相互作用によって、酵素活性の増減がみられるものが好ましく用いられる。例えば、ATPase活性を有するレセプターなどが好ましい。

#### 【0036】

また、本発明における無細胞タンパク質合成系とは、細胞を用いずに核酸類内に含まれる情報を元にタンパク質やポリペプチドを合成する技術を言い、具体的にはmRNAを添加してタンパク質やポリペプチド鎖を合成する無細胞翻訳系、あるいはDNAからの情報を元にmRNAを合成し、さらにタンパク質やポリペプチド鎖を合成する無細胞転写翻訳共役系のいずれでもよい。

#### 【0037】

さらに、本発明における無細胞タンパク質合成系においては、コムギ胚芽抽出液、大腸菌細胞抽出液、網状赤血球抽出液が好適に使用される。

#### 【0038】

更に好ましくはコムギ胚芽抽出液が使用される。最近、タンパク質合成阻害物質を除去することによりタンパク質合成効率を飛躍的に向上させることが出来るようになることが報告されており(Madin K et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 559-564)、その原理を用いた製品が販売されていることから(PROTEIOS cell-free protein synthesis kit: 東洋紡製)、それを用いることが好ましいといえる。

#### 【0039】

無細胞タンパク質合成方法を用いてタンパク質を合成する方法としては公知の方法をそのまま用いることができ、市販キットを用いる場合にはその説明書に従って合成することができる。

#### 【0040】

本発明に用いる候補物質は、レポータータンパク質の活性化等に何らかの影響を与えると推測されるものであれば、低分子、高分子の有機化合物、糖類、タンパク質、無機イオン類、金属イオン類など特に限定されるものではないが、生態系のタンパク質の複雑な相互作用を解析する目的では、候補物質としてはタンパク質(候補タンパク質)であることが好ましい。

#### 【0041】

本発明にもちいる候補タンパク質は、天然物からの抽出物、合成物いずれでも良い。合成物の場合、いかなる方法を用いて合成してもよいが、好ましくは無細胞タンパク質合成方法が用いられる。また、無細胞タンパク質合成により得られたタンパク質は不純物が少ないため、レポータータンパク質の状態の変化、特に活性の変化の測定を容易にかつ正確に行うことができる。

#### 【0042】

また、本発明に用いるタンパク質間相互作用検出用タンパク質はシグナル伝達系タンパク質であることが好ましい。

ここでいうシグナル伝達系タンパク質とは、細胞内シグナル伝達経路に関与する一連のタンパク質の総称またはその一部を指す。具体的には、プロテインキナーゼ、プロテインフォスファターゼ、レセプター、転写因子などが好ましく、さらに具体的には、プロテインキナーゼとしては、MAPキナーゼ、MAPキナーゼキナーゼ、プロテインキナーゼC、非受容体型チロシンキナーゼなど、プロテインフォスファターゼとして、カルシニューリン、MAPキナーゼフォスファターゼなど、レセプターとして、EGFレセプター、PDGFレセプターなど、転写因子として、c-Fos、c-Junなどを用いることができる。

#### 【0043】

また、本発明では、これらのレセプタータンパク質の活性変化を測定することにより、容易に候補タンパク質をスクリーニングすることができる。

【0044】

一方で、本発明でいう候補タンパク質としては、特に限定されず、レポータータンパク質に相互作用すると思われるタンパク質全般を含む。スクリーニングの際には、候補タンパク質を単独であっても良いし、複数の候補タンパク質を同時に作用させても良く、さらには候補タンパク質が含まれるであろうライブラリーなどからさまざまなタンパク質を共発現させた混合物のようなものでも良い。

【0045】

また、具体的にスクリーニングする方法としては、ライブラリーをいくつかのグループに分け、無細胞タンパク質合成系で個々のグループのタンパク質を発現させ、それぞれグループ毎に発現させたタンパク質のプールを加えた条件下でレポータータンパク質を無細胞合成し、レポータータンパク質の活性を測定し、まずどのグループに目的の候補タンパク質が含まれるかを推定し、更にグループを分割して解析して行く方法が挙げられる。

【0046】

後述する実施例では、MAPキナーゼをレポータータンパク質として、候補タンパク質としてMAPキナーゼキナーゼの構成的活性型変異体 (Brunet A et al.

(1994) Oncogene 9, 3379-3387) を用いて行ったが、MAPキナーゼキナーゼの構成的活性型変異体が候補タンパク質のグループのうち約1/100存在するだけでも、レポータータンパク質 (MAPキナーゼ) の活性化を測定することが可能であったことから、本発明はスクリーニングに非常に有効であることが示された。

【0047】

また、本発明は、タンパク質を該タンパク質と相互作用の予想される候補物質の存在下で無細胞タンパク質合成方法を用いて合成し、相互に反応させることにより、不活性化または活性化されたタンパク質を取得する方法を提供する。

【0048】

ここで言う候補物質とは、活性型もしくは不活性型のタンパク質と相互作用するタンパク質とは、活性型もしくは不活性化のタンパク質と相互作用し、活性状態のタンパク質であれば不活性化させ、不活性状態のタンパク質であれば活性化させる物質である。

【0049】

活性型もしくは不活性型のタンパク質と相互作用するタンパク質としては、野生型タンパク質を用いても良いが、そのタンパク質自身も活性化が必要な場合があり、必要に応じて変異を導入して、活性化して用いることができる。変異としては、点突然変異、欠失などを挙げることができる。実際本発明の有意性を示す実施例には、プロテインキナーゼの一種であるMEK1に、2箇所のアミノ酸置換と1箇所の欠失を導入することにより、MEK1を他のタンパク質からの制御を受けない構成的活性型変異体を作成し、これを用いてプロテインキナーゼの一種であるERK2の活性化を示した。ERK2は変異型のMEK1により活性化され、本発明の有意性が示された。

【0050】

また、本発明は、上記方法に従って活性化または不活性化されたタンパク質である。タンパク質としてはシグナル伝達系タンパク質が好ましい。

この方法を用いることにより、従来法では非常に煩雑であった活性化もしくは不活性化タンパク質の調整を非常に短時間で終わらせることができ、また、不純物が少なく、解析に用いるのに適したタンパク質を容易に得ることができる。

従って、このタンパク質を用いることにより、タンパク質の活性、不活性状態での構造変化、修飾変化などの解析を行うことも容易となる。

【0051】

以下、本発明におけるタンパク質相互作用のスクリーニング法について詳細に説明する。本発明に使用される無細胞抽出液は、通常のいかなる組成のものを用いてもよい。しかし、タンパク質合成効率や、取扱の簡便さを考慮すると、コムギ胚芽由来抽出液を用いるのが



望ましい。無細胞タンパク質合成反応液には、無細胞抽出液のほか、目的のタンパク質をコードするDNAあるいはRNA、DNAを用いる場合にはRNAポリメラーゼ、アミノ酸、緩衝液、ATPまたはGTPなどのエネルギー源、クレアチンリン酸、クレアチンキナーゼ等のATP再生系、安定化剤、RNase阻害剤等を適量加える。反応温度は、23-26℃が適している。

#### 【0052】

タンパク質合成の鋳型となるmRNAは、DNAからRNAポリメラーゼによる転写反応により提供される。本発明に用いられるRNAポリメラーゼは、通常のいかなる構造の物を用いてもよい。しかし、mRNA転写効率や、取扱の簡便さを考慮すると、市販のT7、SP6等のウィルス由来のRNAポリメラーゼが望ましい。

10

#### 【0053】

本発明に用いられる鋳型DNAは、RNAポリメラーゼが結合するプロモータ配列と、その下流に目的遺伝子のオープンリーディングフレームが配置される構造を持つ。望ましくは、プロモータとオープンリーディングフレームとの間に翻訳増強配列が含まれるものが良い。また、適当なベクター上に配置されたプラスミドDNAの形態であることが望ましい。本発明におけるDNAの転写は、合成するタンパク質をコードするDNAを全て混合した状態で一反応系で行ってもよいし、もちろん、各タンパク質をコードする遺伝子から別個にRNAを合成し、合成後に任意の割合で各RNAを混合しても良い。

#### 【0054】

本発明に用いられる候補タンパク質の遺伝子は、レポータータンパク質に対して相互作用する可能性が示唆される既知タンパク質の遺伝子もしくは構造的に作用を及ぼす可能性が高い機能的に未知なタンパク質の遺伝子を任意に選択したものであってもよいし、ランダムもしくは網羅的にあらゆる遺伝子を包含したものであってもよい。

#### 【0055】

##### 【実施例】

本願発明の詳細を実施例で説明する。本願発明はこれら実施例によって何ら限定されるものではない。

#### 【0056】

##### 実施例1

ヒト由来ERK2 (MAPK1) 遺伝子のクローニング

30

HeLa細胞由来のmRNAを単離精製し、これを鋳型として逆転写反応によりcDNAを合成した。逆転写反応には、ReverTra Ace (R) (東洋紡績製)を用いた。合成したcDNAを鋳型として、センスプライマーMAPK1-F (配列番号1)とアンチセンスプライマーMAPK1-R (配列番号2)を用い、PCR反応を行った。PCR反応には、KOD-Plus-DNAポリメラーゼ (東洋紡績製)を使用し、各プライマー50 pmol、硫酸マグネシウム1mM、dATP、dTTP、dCTP、dGTP各0.2mM、KOD-Plus専用バッファーを1x濃度、KOD-Plus-DNAポリメラーゼ1ユニット、最終液量50μlの反応系で、94℃2分、[94℃15秒、60℃20秒、68℃1分] x 25サイクルの温度で反応を行った。PCR産物を精製し、無細胞タンパク質合成キット「PROTEIOS (TM)」付属の専用ベクター pEU3-NIIのEcoRVサイトにサブクローニングを行い、プラスミドpEU-MAPK1を構築した。

40

#### 【0057】

##### 実施例2

ヒト由来MEK1遺伝子の構成的活性型変異体のクローニング

HeLa細胞由来のmRNAから逆転写したcDNAを鋳型として、5ステップのnested-PCRを行うことにより、MEK1遺伝子の増幅と構成的活性型変異の導入を同時にを行った。

具体的には、HeLa細胞由来のmRNAを単離精製し、これを鋳型として逆転写反応によりcDNAを合成した。逆転写反応には、ReverTra Ace (R) (東洋紡績 50

製)を用いた。合成したcDNAを鋳型として、センスプライマーMEK1-F(配列番号3)とアンチセンスプライマーMEK1-R(配列番号4)を用い、PCR反応を行った(第一ステップ)。PCR反応には、KOD-Plus-DNAポリメラーゼ(東洋紡績製)を使用し、各プライマー50 pmol、硫酸マグネシウム1mM、dATP、dTTP、dCTP、dGTP各0.2mM、KOD-Plus-専用バッファーを1x濃度、KOD-Plus-DNAポリメラーゼ1ユニット、最終液量50  $\mu$ lの反応系で、94℃2分、[94℃15秒、60℃20秒、68℃1分] x 20サイクルの温度で反応を行った。増幅したPCR産物を鋳型として、センスプライマーMEK1-FとアンチセンスプライマーMEK1-CAR(配列番号5)およびセンスプライマーMEK1-CAF(配列番号6)とアンチセンスプライマーMEK1-Rの二種の組み合わせのプライマーを用いて、前記と同じ反応条件でPCR反応を行った(第二ステップ)。MEK1-CAFとMEK1-CARには、アミノ酸置換(Ser218Glu、Ser222Glu)を導入する塩基配列を含んでいる。二種のPCR産物を鋳型として、センスプライマーMEK1-FとアンチセンスプライマーMEK1-Rを用いて、前記と同じ反応条件でPCR反応を行った(第三ステップ)。増幅したPCR産物を鋳型として、センスプライマーMEK1-FとアンチセンスプライマーMEK1-AaR(配列番号7)およびセンスプライマーMEK1-AaF(配列番号8)とアンチセンスプライマーMEK1-Rの二種の組み合わせのプライマーを用いて、前記と同じ反応条件でPCR反応を行った(第四ステップ)。MEK1-AaFとMEK1-AaRには、525位のAat I切断部位を破壊するサイレント変異を導入する塩基配列を含んでいる。二種のPCR産物を鋳型として、センスプライマーMEK1-FとアンチセンスプライマーMEK1-Rを用いて、前記と同じ反応条件でPCR反応を行った(第五ステップ)。増幅したPCR産物を、前述のpEU3-NIIベクターのEcoRVサイトにサブクローニングし、中間体プラスミドpEU-MEK1-XEを構築した。このプラスミドを2箇所のAat Iサイトで切断し、Ligation反応で再び連結することによって、その間のDNA断片を欠失させ、pEU-MEK1-CAを構築した。

【0058】

#### 実施例3

MEK1構成的活性型変異体の無細胞タンパク質合成系による合成

上記のプラスミドpEU-MEK1-CAを鋳型として、Thermo T7 RNAポリメラーゼ(東洋紡績製)によりmRNAの合成をそれぞれ行った。合成したmRNAをG-25マイクロスピナラム(Amersham社製)を用いて精製、「PROTEIOS(TM)」付属のバッファーミックス溶液にバッファー置換し、重層法による無細胞タンパク質合成を行った。

重層法反応は、96穴プレートにおいて、滅菌水1.8  $\mu$ l、「PROTEIOS(TM)」付属のバッファー#2 2.0  $\mu$ l、「PROTEIOS(TM)」付属のクレアチンキナーゼ(10mg/ml) 1.7  $\mu$ l、RNアーゼ阻害剤(40U/ $\mu$ l、東洋紡績製) 1.0  $\mu$ l、「PROTEIOS(TM)」付属のコムギ胚芽抽出液10.0  $\mu$ l、バッファー置換したpEU-MAPK1由来の精製mRNA液(0.3~0.4  $\mu$ g/ $\mu$ l) 33.5  $\mu$ lからなるリアクションミックス溶液を、あらかじめ96穴プレートに分注したバッファーミックス溶液250  $\mu$ lの下に重層することにより行った。反応は、26℃で16時間行った。合成したERK2タンパク質をG-25マイクロスピナラムを用いて精製、「PROTEIOS(TM)」付属のバッファーミックス溶液にバッファー置換した。

【0059】

#### 実施例4

MEK1構成的活性型変異体存在下でのERK2の無細胞タンパク質合成系による合成

上記のプラスミドpEU-MAPK1を鋳型として、Thermo T7 RNAポリメラーゼ(東洋紡績製)によりmRNAの合成をそれぞれ行った。合成したmRNAをG-25マイクロスピナラム(Amersham社製)を用いて精製、「PROTEIOS(TM)」

(TM)」付属のバッファーミックス溶液にバッファー置換し、重層法による無細胞タンパク質合成を行った。

重層法反応は、96穴プレートにおいて、滅菌水 $1.8\mu\text{l}$ 、「PROTEIOS (TM)」付属のバッファー#2  $2.0\mu\text{l}$ 、「PROTEIOS (TM)」付属のクレアチンキナーゼ ( $10\text{mg}/\text{ml}$ )  $1.7\mu\text{l}$ 、RNアーゼ阻害剤 ( $40\text{U}/\mu\text{l}$ 、東洋紡績製)  $1.0\mu\text{l}$ 、「PROTEIOS (TM)」付属のコムギ胚芽抽出液 $10.0\mu\text{l}$ 、バッファー置換したpEU-ERK2由来の精製mRNA溶液 ( $0.3\sim 0.4\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )  $13.4\mu\text{l}$ 、バッファー置換したMEK1構成的活性型変異体の精製タンパク質溶液 $20.1\mu\text{l}$ からなるリアクションミックス溶液を、あらかじめ96穴プレートに分注したバッファーミックス溶液 $250\mu\text{l}$ の下に重層することにより行った。反応は、 $26\pm 10^\circ\text{C}$ で16時間行った。

【0060】

#### 実施例5

##### ERK2の酵素活性測定

無細胞タンパク質合成により合成したERK2の活性測定を行った。

具体的には、無細胞タンパク質合成反応終了液を、G-25マイクロスピカラム (Amersham社製) を用いて、MAPキナーゼバッファー ( $25\text{mM}$  Tris-HCl,  $\text{pH}7.5$ 、 $0.5\text{mM}$  EDTA、 $0.5\text{mM}$  EGTA、 $0.05\%$  Triton X-100) にバッファー置換を行った。このバッファー置換後のタンパク質溶液をサンプル液として活性測定を行った。活性測定には、p42/p44 MAP Kinase Enzyme Assay System (Amersham社製) を用いた。その結果を図1に示す。MEK1構成的活性型変異体を加えずに合成反応を行った際のERK2に比べ、MEK1構成的活性型変異体を加えて無細胞タンパク合成反応を行った際のERK2は、1000倍を超える活性の増強が確認された。この結果はERK2がMEK1により活性化されたことを強く示唆しており、この2種類のタンパク質が相互作用する関係にあることが改めて証明されるに至った。この結果は、本発明が、相互の関係が不明確である2種類のタンパク質の相互作用の有無を証明するのに有効な手段であることを示す好例であると考えられ、他の種類のシグナル伝達系タンパク質への応用が可能になると期待される。

【0061】

30

#### 実施例6

MEK1構成的活性型変異体と他のタンパク質との無細胞タンパク質合成系による同時合成

上記のプラスミドpEU-MAPK1と、同じくpEU3-NIIベクターにクローニングした無関係の遺伝子99種類と上記のpEU-MEK1-CAをそれぞれ等量混合したプラスミド混合液 (以下、ライブラリ) を、1:1の割合で混合したものを鋳型として、Thermo T7 RNAポリメラーゼ (東洋紡績製) によりmRNAの合成を行った。合成したmRNAをG-25マイクロスピカラム (Amersham社製) を用いて精製、「PROTEIOS (TM)」付属のバッファーミックス溶液にバッファー置換し、重層法による無細胞タンパク質合成を行った。

40

重層法反応は、96穴プレートにおいて、滅菌水 $1.8\mu\text{l}$ 、「PROTEIOS (TM)」付属のバッファー#2  $2.0\mu\text{l}$ 、「PROTEIOS (TM)」付属のクレアチンキナーゼ ( $10\text{mg}/\text{ml}$ )  $1.7\mu\text{l}$ 、RNアーゼ阻害剤 ( $40\text{U}/\mu\text{l}$ 、東洋紡績製)  $1.0\mu\text{l}$ 、「PROTEIOS (TM)」付属のコムギ胚芽抽出液 $10.0\mu\text{l}$ 、バッファー置換したライブラリ由来の精製mRNA等量混合液 ( $0.3\sim 0.4\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )  $33.5\mu\text{l}$ からなるリアクションミックス溶液を、あらかじめ96穴プレートに分注したバッファーミックス溶液 $250\mu\text{l}$ の下に重層することにより行った。反応は、 $26^\circ\text{C}$ で16時間行った。

【0062】

#### 実施例7

50

MEK1構成的活性型変異体および他のタンパク質存在下でのERK2の無細胞タンパク質合成系による合成

上記のプラスミドpEU-MAPK1を鋳型として、Thermo T7 RNAポリメラーゼ（東洋紡績製）によりmRNAの合成をそれぞれ行った。合成したmRNAをG-25マイクロスピナラム（Amersham社製）を用いて精製、「PROTEIOS (TM)」付属のバッファ-ミックス溶液にバッファ-置換し、重層法による無細胞タンパク質合成を行った。

重層法反応は、96穴プレートにおいて、滅菌水 $1.8\mu\text{l}$ 、「PROTEIOS (TM)」付属のバッファ-#2  $2.0\mu\text{l}$ 、「PROTEIOS (TM)」付属のクレアチンキナーゼ ( $10\text{mg}/\text{ml}$ )  $1.7\mu\text{l}$ 、RNアーゼ阻害剤 ( $40\text{U}/\mu\text{l}$ 、東洋紡績製)  $1.0\mu\text{l}$ 、「PROTEIOS (TM)」付属のコムギ胚芽抽出液  $10.0\mu\text{l}$ 、バッファ-置換したpEU-ERK2由来の精製mRNA溶液 ( $0.3\sim 0.4\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )  $13.4\mu\text{l}$ 、バッファ-置換したライブラリ由来の精製タンパク質溶液  $20.1\mu\text{l}$ からなるリアクションミックス溶液を、あらかじめ96穴プレートに分注したバッファ-ミックス溶液  $250\mu\text{l}$ の下に重層することにより行った。反応は、 $26^\circ\text{C}$ で16時間行った。

【0063】

実施例8

ERK2の酵素活性測定

無細胞タンパク質合成系により合成したERK2の活性測定を行った。

具体的には、無細胞タンパク質合成反応終了液を、G-25マイクロスピナラム（Amersham社製）を用いて、MAPキナーゼバッファ- ( $25\text{mM}$  Tris-HCl,  $\text{pH}7.5$ ,  $0.5\text{mM}$  EDTA,  $0.5\text{mM}$  EGTA,  $0.05\%$  Triton X-100) にバッファ-置換を行った。このバッファ-置換後のタンパク質溶液をサンプル液として活性測定を行った。活性測定には、p42/p44 MAP Kinase Enzyme Assay System (Amersham社製)を用いた。その結果を図2に示す。あらかじめ加えたタンパク質をMEK1構成的活性型変異体のみで構成された場合のERK2の活性を100とした場合、ライブラリ由来のタンパク質を加えた場合の活性は、18となった。MEK1の発現量はERK2の1/100前後と推察されるが、等量で発現させた場合には及ばないものの、明らかにMEK1がERK2に作用していることが示された。この結果から、1プールあたり100クローンからなる遺伝子発現ライブラリを用いて、ERK2に相互作用を及ぼす未知または既知のタンパク質の遺伝子を同定することができることは容易に推察される。またこの結果を応用して、ある特定のシグナル伝達系タンパク質に影響を及ぼす未知または既知のタンパク質の遺伝子を同定することができることは容易に推察される。

【0064】

【発明の効果】

本発明により、あるタンパク質の活性を制御する物質のハイスループットなスクリーニングが可能となった。さらに本発明の方法を用いることにより、活性化または不活性化されたタンパク質を効率的かつ簡便に調整できるようになった。従って本発明によれば、目的タンパク質を活性化または不活性化するような物質を容易にスクリーニングすることができ、また、活性化または不活性化されたタンパク質を簡便に調整できる。また、さまざまな物質がタンパクに与える影響を調べることができ、物質の毒性や生体に与える影響の解明、疾患の解明、医薬品の開発などに寄与することができる。

【0065】

【配列表】

配列番号1

配列の長さ：21

配列の型：核酸 (DNA)

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

CTTCCTTCCT CTCCTCGGTCA G

【0066】

配列番号2

配列の長さ：21

配列の型：核酸 (DNA)

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

CCTCTGAGCC CTTGTCCTGA C

【0067】

配列番号3

配列の長さ：20

配列の型：核酸 (DNA)

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ATGCCCAAGA AGAAGCCGAC

【0068】

配列番号4

配列の長さ：20

配列の型：核酸 (DNA)

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

TTAGACGCCA GCAGCATGGG

【0069】

配列番号5

配列の長さ：30

配列の型：核酸 (DNA)

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GAACTCGTTG GCCATCTCGT CGATGAGCTG

【0070】

配列番号6

配列の長さ：29

配列の型：核酸 (DNA)

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GACGAGATGG CCAACGAGTT CGTGGGCAC

【0071】

10

20

30

40

50

配列番号 7

配列の長さ: 22

配列の型: 核酸 (DNA)

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

配列

ACATATGTCA GTCCTTTTAT TA

【0072】

配列番号 8

10

配列の長さ: 22

配列の型: 核酸 (DNA)

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

配列

TAATAAAAGG ACTGACATAT CT

【図面の簡単な説明】

【図1】 ERK2の存在下でMEK1構成的活性型変異体を発現させた場合と発現させなかった場合のERK2タンパク質の酵素活性を示す図。

20

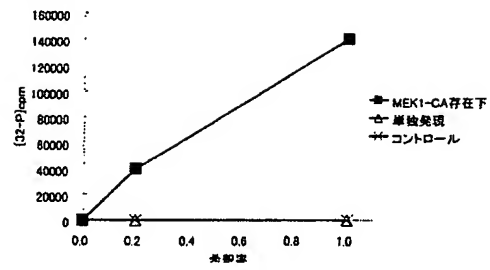
縦軸にERK2の活性(基質ペプチドへの32Pの付加活性)を、横軸にサンプルの希釈率を示す。(単独): mRNAを加えずに反応を行った場合、(発現): pEU-MEK1-CA由来のmRNAを加えてMEK1-CAを発現させた場合、(コントロール): ERK2を反応系に添加しなかった場合。

【図2】 MEK1構成的活性型変異体遺伝子を含むライブラリをERK2タンパク質存在下で発現させた場合のERK2タンパク質の酵素活性を示す図。

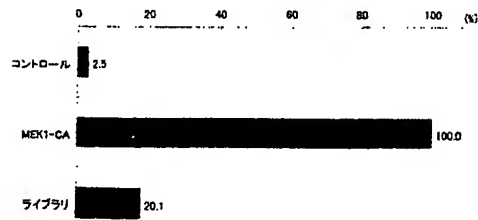
横軸にERK2の相対活性を示す。pEU-MEK1-CA由来のもののみで構成されるmRNAを添加した場合のERK2の活性値を100とし、ライブラリ由来のmRNAを添加した場合(ライブラリ)、ERK2単独で発現させた場合(コントロール)の相対値を示す。

30

【図1】



【図2】



---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

G 0 1 N 33/566

F I

G 0 1 N 33/566

テーマコード (参考)

F ターム (参考) 4B024 AA11 BA10 BA11 BA63 CA12  
4B063 QA05 QA18 QQ27 QQ33 QQ79 QR07 QR13 QR41 QR48 QS02  
4B064 AG01 CA50 CC24 DA13  
4H045 AA10 AA20 AA30 CA40 DA50 DA89 EA50 FA74



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**